


国家科学技术学术著作出版基金资助出版

途径工程

——第三代基因工程

张惠展 编著

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

途径工程——第三代基因工程/张惠展编著. —北京:
中国轻工业出版社, 2002. 1
ISBN 7-5019-3462-2

I. 途… II. 张… III. 基因-遗传工程
IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 075961 号

责任编辑: 李 菁 责任终审: 滕炎福 封面设计: 赵小云
版式设计: 丁 夕 责任校对: 燕 杰 责任监印: 吴京一

*

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

联系电话: 010-65241695

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2002 年 1 月第 1 版 2002 年 1 月第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 16

字 数: 384 千字 印数: 1—3000

书 号: ISBN 7-5019-3462-2/Q·013

定 价: 33.00 元

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

前 言

世界的丰富多彩是因为生命的存在,而生命诞生、发育、生长、病变、衰老乃至死亡的全过程均由基因控制。DNA 或 RNA 链上碱基的线性排列顺序编码着生命运动的时空四维信息,甚至就连高等哺乳动物和人类的思维与智商亦与基因有关。因此,在活的生物细胞内通过基因操作,局部设计、改造和更新固有的代谢途径,就能达到认识生命、改造生命和优化生命之目的,这是第三代基因工程——途径工程研究的基本内容。

与飞速发展的传统基因工程技术相比,途径工程在生物细胞代谢途径解析、定位修饰改良以及目标代谢流提高等方面的尝试,还处于起步阶段。有效的途径修饰需要建立代谢物及其调控的定性定量分析手段,同时对基因操作也提出了更高更精细的技术要求。事实上,途径工程以 DNA 重组技术作为一种操作平台,将细胞生物学、分子生物学、分子反应动力学和生物工程学原理的模块,按照人们的意愿组装成一个崭新的整体,并使之最终体现在生物细胞代谢网络的功利性改造中。因此从某种意义上来说,途径工程是一种分子系统工程。将上述理论、战略、技术以及应用作一系统性的阐述,是本书撰写的主要意图。

本书从生物细胞内代谢途径的物流和能流的分析入手,揭示代谢网络的刚柔统一规律以及初级代谢与次级代谢之间的偶联关系;以几种典型的酶分子结构为例,考察酶对底物的相对专一性以及从基因水平上设计酶分子催化特性的限度,并抽象出代谢途径设计的普遍法则;最后通过对若干代谢途径设计改造成功范例的描述,指出途径工程的广泛应用前景。

应当指出的是,途径工程作为一个研究领域,在国际上也是近几年的事,国内只有零星几篇综述介绍,专著更是凤毛麟角。本书撰写的主要资料来源是由 Gregory N. Stephanopoulos、Aristos A. Aristidou 和 Jens Nielsen 合著的《Metabolic Engineering》(Academic Press, 1998)以及近百篇相关专题综述。

本书是著者于 2000 年出版的《基因工程概论》(华东理工大学出版社)的姊妹篇,侧重于途径工程应用的设计思路,并力求以图解的方式加深理解和印象,因而较为适合于从事生命科学相关领域研究的科研人员以及化工、轻工、制药、食品、能源、环保、纺织、信息等行业的工程技术人员阅读,同时也可作为生命科学各专业本科生和研究生的课程教学参考书。

本书得到华东理工大学研究生教育资金资助。全书第 1、4、6 部分由张惠展编写,第 2 部分由吴海珍编写,第 3 部分由唐雅珺编写,第 5 部分由孙丽萍编写,全书由张惠展统筹。书中 200 余幅图表由叶江利用苹果电脑专门作图软件精心策划和制作,德国乌泊塔尔大学 W. Piepersberg 实验室的张长生博士为本书撰写提供了大量参考资料,著者在此对他们表示衷心的感谢。

真诚欢迎专家和读者对本书提出宝贵意见。

著 者

2001 年 8 月 15 日

定稿于黄浦江畔

目 录

1 概述	1
1.1 途径工程的基本概念	1
1.1.1 途径工程的基本定义	1
1.1.2 途径工程的基本过程	3
1.1.3 途径工程的基本原理	5
1.2 途径工程的研究内容	7
1.2.1 途径工程的研究概要	7
1.2.2 途径工程的研究技术	8
1.2.3 途径工程的研究战略	8
1.3 途径工程的研究意义	11
1.3.1 生物工程的学科体系	11
1.3.2 途径工程的重要地位	12
1.3.3 途径工程的发展前景	17
2 细胞代谢途径的解析与控制	20
2.1 细胞代谢的基本概念	20
2.1.1 胞内代谢概况	20
2.1.2 胞内代谢的物料平衡与数据的重现性	23
2.2 代谢途径的组合	24
2.3 细胞代谢流的分析与测定	28
2.3.1 细胞代谢流分析的基本理论	28
2.3.2 解脂假丝酵母柠檬酸发酵代谢流的分析	31
2.3.3 细胞代谢流的测定	32
2.4 代谢网络的结构分析及其应用	33
2.4.1 代谢网络结构组成的基本概念	33
2.4.2 代谢刚性	34
2.4.3 代谢网络结构的基本类型	35
2.4.4 代谢网络的节点	36
2.4.5 网络应答(Network Response)	38
2.4.6 主要节点刚性的评估	39
2.4.7 1,6-二磷酸果糖的超量生产	39

2.5	代谢控制分析	44
2.5.1	代谢控制分析的基本理论	44
2.5.2	代谢途径分析的应用	46
2.5.3	代谢控制分析的局限性	48
3	途径操作的基本原理与技术	50
3.1	原核生物的同源重组	50
3.1.1	原核细菌的基因转移程序	50
3.1.2	与同源重组有关的原核生物基因	54
3.1.3	同源重组途径	57
3.1.4	同源重组模型	58
3.1.5	同源重组的影响因素	60
3.1.6	同源重组在途径操作中的实际应用	60
3.2	真核生物的基因打靶	66
3.2.1	真核细胞的基因导入方法	66
3.2.2	基因打靶的战略	76
3.2.3	提高基因打靶效率的途径	80
3.2.4	基因敲除的实际应用	81
3.3	转座子与转座作用	81
3.3.1	插入顺序	82
3.3.2	复合元件	83
3.3.3	转座的分子机制	84
3.4	逆转录病毒与逆座子	86
3.4.1	包含类似转座过程的逆转录病毒生活周期	87
3.4.2	酵母转座子 Ty 元件的结构与功能	92
3.4.3	逆座子的基本特性	93
4	初级代谢的途径工程	95
4.1	乙醇	95
4.1.1	发酵生产乙醇的战略	95
4.1.2	酵母菌属乙醇发酵途径的改良	98
4.1.3	移动发酵单胞菌中戊糖代谢途径的引入	100
4.1.4	梭菌属生产乙醇的可行性分析	101
4.1.5	高产乙醇的重组大肠杆菌的构建	102
4.1.6	产酸克雷伯氏菌中乙醇生成途径的引入	104
4.1.7	直接利用太阳能合成乙醇的光合细菌途径设计	105
4.2	有机酸醇	106
4.2.1	丙酮丁醇	107
4.2.2	1,2-丙二醇	109
4.2.3	1,3-丙二醇	110

4.2.4	丙三醇(甘油)	111
4.2.5	木糖醇	112
4.2.6	琥珀酸	112
4.2.7	乳酸	114
4.2.8	联乙酰	115
4.3	氨基酸	116
4.3.1	氨基酸途径工程的操作战略	117
4.3.2	苏氨酸工程菌的构建	117
4.3.3	异亮氨酸工程菌的构建	120
4.3.4	芳香族氨基酸工程菌的构建	121
4.3.5	赖氨酸工程菌的构建	123
4.3.6	丙氨酸工程菌的构建	126
4.4	维生素	126
4.4.1	维生素 C	127
4.4.2	生物素	128
4.4.3	维生素 A	129
4.4.4	辅酶 Q	130
4.5	生物色素	136
4.5.1	靛蓝	136
4.5.2	类胡萝卜素	136
4.6	多聚物	141
4.6.1	聚羟烷酸酯(PHAs)	142
4.6.2	聚羟丁酯戊酯共聚物(PHBV)	143
4.6.3	产多聚物的转基因植物	144
4.6.4	果聚糖	145
4.6.5	黄原胶	146
4.7	氢气	149
5	次级代谢的途径工程	151
5.1	聚酮类抗生素的生物合成途径	151
5.1.1	红霉素	151
5.1.2	雷帕霉素	156
5.1.3	利福霉素	158
5.1.4	除虫菌素	160
5.1.5	泰乐菌素	162
5.1.6	道诺红菌素和阿霉素	164
5.1.7	丁省霉素	166
5.1.8	放线菌紫素	167
5.1.9	光神霉素	168

5.1.10	乌达霉素	170
5.2	聚酮生物合成的途径操作	170
5.2.1	聚酮生物合成的分子机制	171
5.2.2	聚酮合酶各组成模件的操作战略	171
5.2.3	聚酮生物合成基因的异源表达	174
5.3	非核糖体肽类化合物的途径操作	175
5.3.1	非核糖体肽合成酶结构与催化机制	176
5.3.2	杂合肽-聚酮天然产物的生物合成	177
5.3.3	NRPS 和 PKS 功能杂合模式的遗传学证据	184
5.3.4	杂合肽-聚酮类代谢物途径操作的发展前景	187
5.4	β -内酰胺类抗生素的途径操作	188
5.4.1	青霉素和头孢菌素的生物合成途径	188
5.4.2	青霉素和头孢菌素的途径代谢流控制	191
5.4.3	青霉素和头孢菌素的途径设计	192
5.4.4	克拉维酸的生物合成途径	193
5.4.5	碳青霉烯类抗生素的生物合成途径	194
5.5	氨基糖苷类抗生素的生物合成途径	197
5.6	林可胺类抗生素的生物合成途径	199
6	细胞遗传特性修饰的途径工程	202
6.1	非生物物质的降解	202
6.1.1	微生物降解非生物物质的战略	202
6.1.2	聚氯联苯的降解	204
6.1.3	氯代烯烃的降解	205
6.1.4	苯、甲苯和对二甲苯混合物的降解	209
6.2	碳氮代谢途径设计	211
6.2.1	氮代谢途径的优化	212
6.2.2	底物吸收的改善	212
6.2.3	底物利用范围的扩展	213
6.2.4	糖酵解途径的修饰	218
6.2.5	葡萄糖效应的解除	218
6.2.6	辅助因子工程	220
6.3	微生物生理特性改良	221
6.3.1	氧利用率的提高	221
6.3.2	超代谢流的防止	222
6.3.3	遗传稳定性的维持	224
6.3.4	蛋白质加工过程的强化	227
6.3.5	生物过程性能的改良	227
6.4	植物遗传特性修饰	228

6.4.1	控制果实成熟的转基因植物	230
6.4.2	抗虫害的转基因植物	231
6.4.3	抗病毒的转基因植物	232
6.4.4	抗除草剂的转基因植物	233
6.4.5	改变花型花色的转基因植物	234
6.4.6	抗环境压力的转基因植物	234
6.4.7	产生高品质产物的转基因植物	234
6.5	转基因动物构建	235
6.5.1	转基因鼠	235
6.5.2	转基因兔、猪和羊	236
6.5.3	转基因牛	237
6.5.4	转基因鸡	237
6.5.5	转基因鱼	237
6.6	基因治疗	238
6.6.1	基因治疗的基本战略	239
6.6.2	治疗基因的选择	240
6.6.3	基因转移的方式	241
6.6.4	转基因表达的控制	243
6.6.5	遗传病的治疗	243

1 概 述

半个多世纪以来,随着分子生物学理论与技术研究的不断深入,人们不仅能精确描述基因表达和调控的分子机制,而且对多种生物细胞内的代谢途径也有了一个全景式的认知。日臻完善的 DNA 重组技术已经允许人们对生物体内的固有代谢途径进行倾向性和功利性的设计与修饰,甚至像心脏搭桥外科手术那样实现细胞天然代谢途径的局部重建。如果说,30 年前主要用于基因克隆和表达的 DNA 重组技术属于第一代基因工程,20 年前在基因水平上对蛋白质的结构与功能进行局部修饰属于第二代基因工程,那么近十年来利用 DNA 重组技术对生物细胞内固有代谢途径进行改造设计的尝试就属于第三代基因工程,即途径工程。

1.1 途径工程的基本概念

1.1.1 途径工程的基本定义

细胞是生命运动的基本功能单位,其所有的生理生化过程(即细胞代谢活性的总和)是由一个可调控的、大约有上千种酶催化反应高度偶联的网络以及选择性的物质运输系统来实现的。在大多数情况下,细胞内生物物质的合成、转化、修饰、运输和分解各过程需要经历多步酶催化的反应,这些反应又以串联的形式组合成为途径,其中前一反应的产物恰好是后一反应的底物。

根据底物在代谢反应中对通用性酶和特异性酶的使用要求,可将细胞内所有的生物分子分成两大类:

(1) 一级基因产物,如 tRNA、rRNA、多糖、脂类、蛋白质和核酸等,其生物合成和分解只需要有限的几种通用性的酶及蛋白因子,包括 RNA 聚合酶、RNA 剪切酶、DNA 聚合酶、糖苷酶、脂酶、氨酰基-tRNA 合成酶、肽基转移酶、核酸酶等。

(2) 二级基因产物,如氨基酸、维生素、抗生素、核苷酸等小分子化合物,它们的生物全合成和降解少则涉及几个基因多则需要几十个基因所编码的酶系,而且这些酶大都具有使用的特异性。上述合成和分解二级基因产物的酶系及其催化的生化反应,构成了一个个相互联系的代谢网络。对代谢网络进行解析不难看出,它们均由若干个串联和并联的简单子途径组成(图 1-1),其中各子途径的并联交汇点称为节点(Node)。

严格地讲,细胞代谢途径实质上就是与一组特定的流入和流出代谢物质相联系的任何一个合理可观察的生化反应序列。因此,某一代谢途径的代谢流(Flux)定义为流入代谢物被途径加工成流出代谢物的速率。强调代谢途径的合理性和可见性十分重要。首先,人为臆想一个毫无意义的反应或者在生物细胞中根本不存在的酶系是毫无价值的;其次,如果不能被实验所观察,再合理的反应序列也是无用的。由于在过去的 50 年里,生物

化学研究杰出的成就就是绘制出了途径多样性和复杂性的代谢图谱,所以分析其合理性和多样性具有重要意义。虽然在特定的流入代谢物和流出代谢物之间存在着多个不同的生化反应序列,但如果这些反应序列的代谢流不能被分别确定的话,就不能获得对细胞代谢途径改造有用的信息。

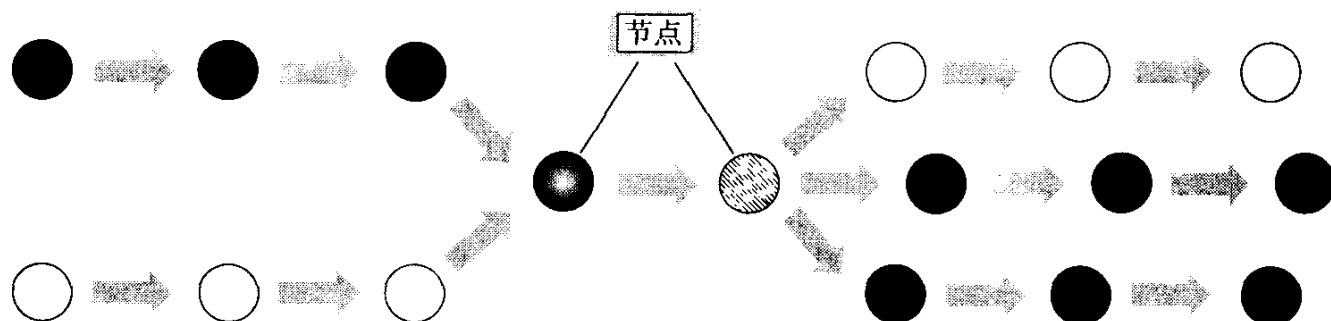


图 1-1 细胞代谢途径示意图

途径工程(Pathway Engineering)是一门利用分子生物学原理系统分析细胞代谢网络,并通过 DNA 重组技术合理设计细胞代谢途径及遗传修饰,进而完成细胞特性改造的应用性学科。由于生物细胞自身固有的代谢途径对于实际应用而言并非最优,因此人们需要对之进行功利性的修饰,途径工程的基本理论及其应用战略就是在这一发展背景下形成的。1974 年,Chakrabarty 在假单胞菌属的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)两个菌种中分别引入几个稳定的重组质粒,从而提高了两者对樟脑和萘等复杂有机物的降解活性,这是途径工程技术的第一个应用实例。在此之后的十几年中,人们更加注重途径工程的应用方法和目的,通常表现在对细胞内特定代谢途径进行功利性改造,并积累了多个成功的范例,但未能形成自己的基本理论体系。1991 年,Bailey 用代谢工程(Metabolic Engineering)的术语来描述利用 DNA 重组技术对细胞的酶反应、物质运输以及调控功能进行遗传操作,进而改良细胞生物活性的过程,这被认为是途径工程或代谢工程向一门系统学科发展的转折点。近年来,虽然众多学者对这一学科的名称及定义有多种精确的界定(表 1-1),但其基本内涵达到了公认的一致,并以途径工程或代谢工程冠名。

表 1-1 代谢工程概念的演变

名 称	定 义
(微生物)途径工程 (Microbiol) Pathway engineering	利用 DNA 重组技术修饰各种代谢途径(包括生物体非固有的代谢途径),提高特定代谢物的产量
代谢工程 Metabolic engineering	利用 DNA 重组技术优化细胞的酶活、运输和调控功能,提高细胞活力
代谢途径工程 Metabolic pathway engineering	生化途径的修饰、设计与构建
代谢工程 Metabolic engineering	利用 DNA 重组技术对代谢进行目的性修饰
途径工程/代谢设计 Pathway engineering/Metabolic design	改造细胞代谢途径,提高天然最终产物产量或合成新产物(包括中间产物或修饰型最终产物)

续表

名 称	定 义
代谢工程 Metabolic engineering	对生化反应的代谢网络进行目的性修饰
代谢工程 Metabolic engineering	为达到所需目标对活细胞的代谢途径进行修饰
代谢工程 Metabolic engineering	利用分子生物学原理系统分析代谢途径,设计合理的遗传修饰战略从而优化细胞生物学特性

然而,由于途径工程或代谢工程的基本原理和技术建立在多学科相互渗透的基础之上,人们往往从完全不同的学科理论体系出发,采取完全不同的研究路线,实现改造或重构细胞代谢途径的目的。据此著者认为,很有必要以研究内容、方法和路线上存在的差异区分途径工程和代谢工程。代谢工程注重以酶学、化学计量学、分子反应动力学以及现代数学的理论和技術为研究手段,在细胞水平上阐明代谢途径与代谢网络之间局部与整体的关系、胞内代谢过程与胞外物质传输之间的偶联以及代谢流流向与控制的机制,并在此基础上通过工程和工艺操作达到优化细胞性能的目的;而途径工程则侧重于利用分子生物学和遗传学原理分析代谢途径各所属反应在基因水平上的表达与调控性质,并借助于DNA重组技术扩增、删除、植入、转移、调控编码途径反应的相关基因,进而筛选出具有优良遗传特性的工程菌或细胞。

使生物细胞具有所期望的遗传特性,并以此为目的对其代谢途径进行设计操作的概念事实上是很古老的,人们早在数十年前就开始分离培育品质优良的抗生素、氨基酸、维生素或有机溶媒生产菌种。这一过程在很大程度上依赖于传统的化学随机突变技术和设计精巧的筛选程序,以分离鉴定具有特定性质的优良菌株。虽然上述传统的方法已被普遍接受且取得了巨大的成就,但是可以推断,更多的具有遗传和代谢优势的生物突变种群仍然由于突变的随机性而难以鉴定和分离。在此过程中,成功意味着科学与运气的互补,而且相当程度上取决于后者。

DNA重组等分子生物学技术的发展为途径操作引入了崭新的理念和方法,它允许人们精确修饰代谢途径中的特定酶促反应以及遗传背景清楚的生物结构。利用DNA重组技术修饰甚至引入新的特定生化反应序列,旨在直接改善细胞的遗传特性尤其是活性物质的生物合成过程。这一过程的一个基本特点就在于对给定靶生化反应进行修饰的特异性以及新反应引入的特异性。一旦待操作的途径反应靶点被确立,先进的分子生物学技术就可用于相关基因或酶分子的操作,包括基因调控元件的更换、基因编码序列的修饰,直至新基因或基因簇(Gene Cluster)的导入和表达。从广义上讲,DNA重组技术适用于这个过程的所有步骤中,因此途径工程是基因工程应用的高级阶段。

1.1.2 途径工程的基本过程

途径工程通过定向改变细胞内代谢途径的分布及代谢流重构代谢网络,进而提高代谢物的产量;外源基因的准确导入及其编码蛋白的稳定表达,可以拓展细胞内现有代谢途

径的延伸路线,以获得新的生物活性物质或者优良的遗传特性。为达到上述目标,途径工程操作至少应包括下列三大基本过程(图 1-2)。

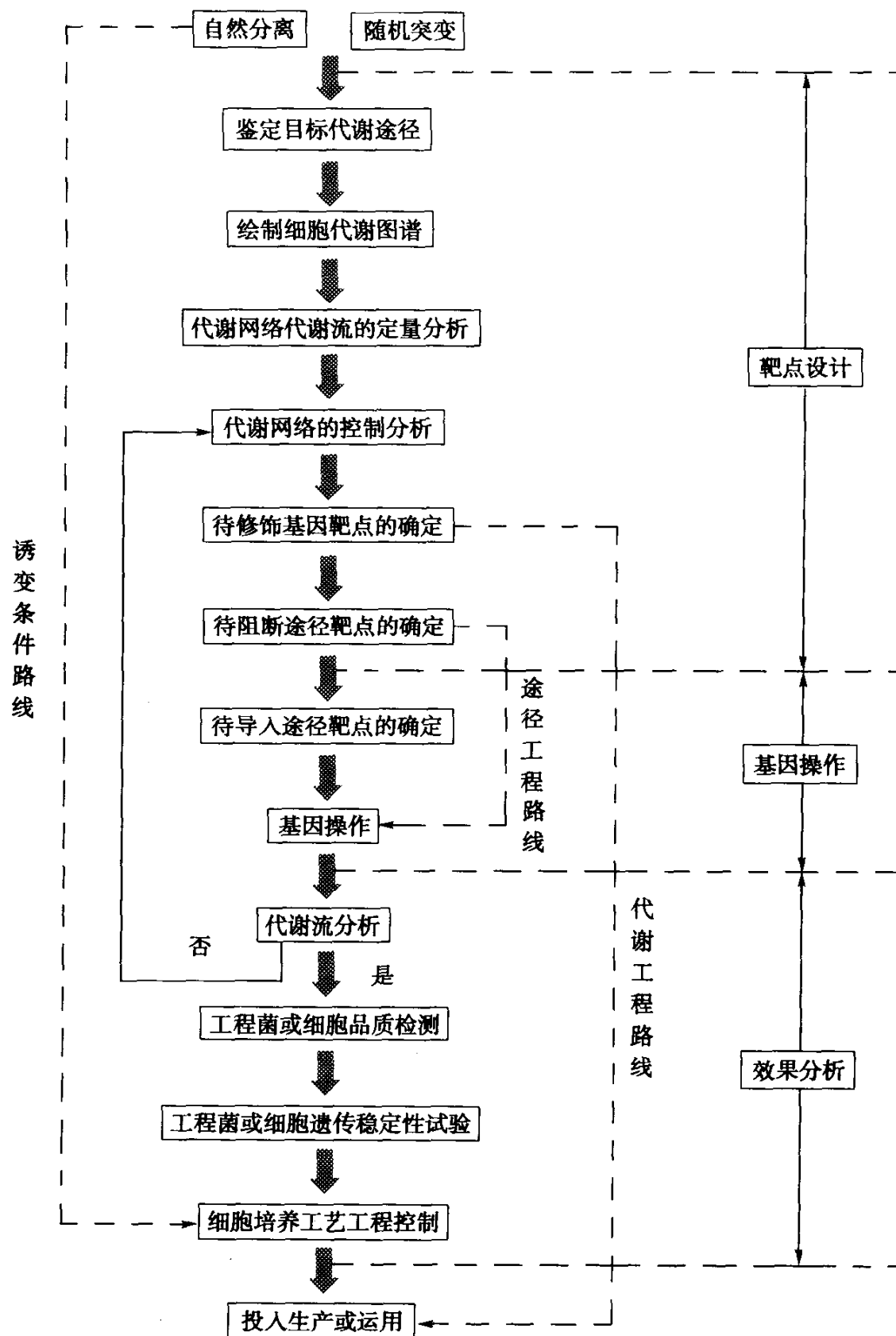


图 1-2 途径工程基本过程

1.1.2.1 靶点设计

虽然所有物种改良程序的目的性都是明确的,但相对于随机突变而言,途径工程的一个显著特点是工作的定向性,因为它在修饰靶点选择、实验设计以及数据分析方面占据绝对优势。然而,从自然界分离具有特殊品质的野生型微生物菌种以及利用传统诱变程序

筛选遗传性状优良的物种,恰恰是途径设计和靶点选择的重要信息资源和理论依据。事实上,迄今为止途径工程应用成功的范例无一不是从这一庞大的数据库中获得创作灵感的,这个过程称为“反向途径工程”。虽然单纯为了获取一个理想代谢途径而采取传统的分离诱变程序并非最佳选择,但这种操作所积累的信息量却具有重大使用价值。

生物化学家在长达数十年的研究中,已对相当数量生物细胞内的代谢途径进行了鉴定,并绘制出较完整的代谢网络图,这对途径工程的实施奠定了基础。然而,正确的靶点设计还必须对现有的代谢途径和网络信息进行更深入的分析。首先,根据化学动力学和计量学原理定量测定网络中的代谢流分布(即代谢流分析,MFA),其中最重要的是细胞内碳和氮元素的流向比例关系;其次,在代谢流分析的基础上调查其控制状态、机制和影响因素(即代谢流控制分析,MCA);最后,根据代谢流分布和控制的分析结果确定途径操作的合理靶点,通常包括拟修饰基因的靶点、拟导入途径的靶点或者拟阻断途径的靶点等。值得强调的是,靶点设计对途径工程的成败起着关键作用,任何精细的靶点选择都必须经得起细胞生理特性以及代谢网络热力学平衡的检验。

1.1.2.2 基因操作

利用途径工程战略修饰改造细胞代谢网络的核心是在分子水平上对靶基因或基因簇进行遗传操作,其中最典型的形式包括基因或基因簇的克隆、表达、修饰、敲除、调控以及重组基因在目标细胞染色体DNA上的稳定整合。后者通常被认为是途径工程重要的特征操作技术,因为在以高效表达基因编码产物为主要目标的基因工程和以生产突变体蛋白为特征的蛋白质工程中,DNA重组分子一般独立于受体细胞染色体而自主复制。

与途径工程不同,在代谢工程的一些应用实例中,代谢流的分布和控制往往绕过基因操作,直接通过发酵和细胞培养的工艺和工程参数控制提高细胞代谢流,并胁迫代谢流流向所期望的目标产物。在此过程中,改变反应体系内的溶氧、pH、补料等因素,在酶或相关蛋白因子水平上激活靶基因的转录(诱导作用)、调节酶的活性(阻遏、变构、抑制或去抑制作用),进而实现改变和控制细胞代谢流的目的。这里必须指出的是,虽然就提高目标产物的产量而言,上述非基因水平的操作与典型的途径工程操作在效果上也许没有显著的差异,但在新产物的合成尤其是遗传性状的改良等方面,基因操作是不可替代的。因为只有引入外源的基因或基因簇,才能从根本上改造细胞的代谢途径,甚至重新构建新的代谢旁路。

1.1.2.3 效果分析

很多初步的研究结果显示,一次性的途径工程设计和操作往往不能达到实际生产所要求的产量、速率或浓度,因为大部分实验涉及到的只是与单一代谢途径有关的基因、操纵子或基因簇的改变。然而通过对新途径进行全面的效果分析,这种由初步途径操作构建出来的细胞所表现出的限制与缺陷可以作为新一轮实验的改进目标。正像蛋白质工程实验所采用的研究策略,如此反复进行遗传操作即可获得优良物种。目前,通过这种途径工程循环获得成功的范例已有不少,所积累的经验有助于鉴定和判断哪一类特定的遗传操作对细胞功能的期望改变是相对有效的。

1.1.3 途径工程的基本原理

途径工程是一个多学科高度交叉的新型领域,其主要目标是通过定向性地组合细胞

代谢途径和重构代谢网络,达到改良生物体遗传性状的目的。因此,它必须遵循下列基本原理:

(1) 涉及细胞物质代谢规律及途径组合的生物化学原理,它提供了生物体的基本代谢图谱和生化反应的分子机理。

(2) 涉及细胞代谢流及其控制分析的化学计量学、分子反应动力学、热力学和控制学原理,这是代谢途径修饰的理论依据。

(3) 涉及途径代谢流推动力的酶学原理,包括酶反应动力学、变构抑制效应、修饰激活效应等。

(4) 涉及基因操作与控制的分子生物学和分子遗传学原理,它们阐明了基因表达的基本规律,同时也提供了基因操作的一整套相关技术。

(5) 涉及细胞生理状态平衡的细胞生理学原理,它为细胞代谢机能提供一个全景式的描述,因此是一个代谢速率和生理状态表征研究的理想平台。

(6) 涉及发酵或细胞培养的工艺和工程控制的生化工程和化学工程原理,化学工程对将工程方法运用于生物系统的研究无疑是最合适的渠道。从一般意义上来说,这种方法在生物系统的研究中融入了综合、定量、相关等概念。更为特别的是,它为速率过程受限制的系统分析提供了独特的工具和经验,因此在途径工程领域中具有举足轻重的意义。

(7) 涉及生物信息收集、分析与应用的基因组学、蛋白质组学原理,随着基因组计划的深入发展,各生物物种的基因物理信息与其生物功能信息在此交汇(图 1-3),并为途径设计提供了更为广阔的表演舞台,这是途径工程技术迅猛发展和广泛应用的巨大推动力。

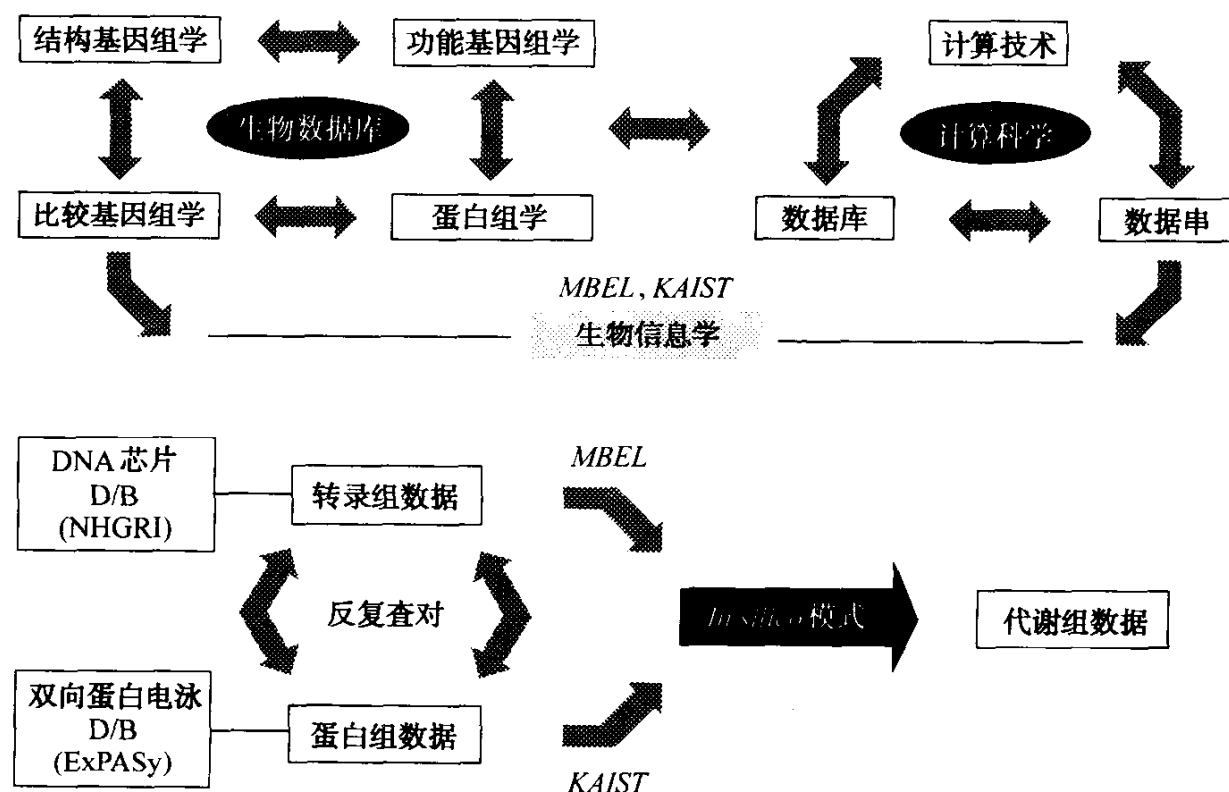


图 1-3 途径设计的信息基础

1.2 途径工程的研究内容

1.2.1 途径工程的研究概要

与其他传统的工程领域相比,途径工程同样强调解析与组合两个特定的步骤,然而在很大程度上途径操作过程基本上是分子生物学原理的一种技术表现形式,真正意义上的工程方面的成分并不占主导地位。严格地讲,生化反应过程的有关内容并不能定义为途径工程。更多更显著的工程成分只是反映在途径工程的分析部分,如怎样辨认能反映细胞生理状态的主要参数,怎样利用这些信息组织一个代谢网络的控制设计,并确定合理靶点以修饰构建特定的物种,怎样进一步评估基因或酶的真实修饰效果,以实施新一轮的途径修饰直到最佳状态的确立,取代普通的定向靶点筛选程序,怎样预测一个合理的过程以确定途径操作的最有效靶点,上述问题是途径工程分析部分应解决的问题。

途径工程的一个崭新观点是关注代谢途径的组合而非单一的反应,因此它必须考察完整的生化反应网络,重视途径和目标产物的热力学可行性、代谢流及其控制。从传统的单一酶反应分析向相互作用的生化反应系统转移是这一组合观点的精髓,其中代谢网络的概念尤其重要,只有这样,生物体代谢运动和细胞功能的图视效果才能被强化。因此,途径工程第一步的工作就是利用在广泛而深入的研究中获得的技术信息进行组合设计。

虽然生化代谢和细胞生理学理论为分析反应途径提供了主要依据,但代谢流确定及其控制的研究结果具有更大的实用性。途径工程最突出的特征也许就是强调生化反应途径与代谢流及其体内条件下的控制相关联。将代谢流的定量分析方法与代谢流控制的分子生物学技术完美结合在一起,系统合理地修饰生物细胞的遗传性状,这是途径工程的基石。在代谢途径和代谢流的结构体系中,途径工程的一个基本目标是阐明代谢流控制的因素和机制,对代谢流控制的全面理解是代谢途径修饰的基础。系统研究代谢流及其控制机制有三大基本步骤:

第一,建立一种能尽可能多地观察途径并测定其流量的方法。为了做到这一点,通常从测定细胞外代谢物的浓度入手进行简单的物料平衡。这里必须强调的是,一个代谢途径的代谢流并不等于该途径中一个或多个酶的活性。事实上,酶法分析并不能提供途径真正的代谢流信息,除非相应的酶在体外分析条件下存在并具有活性。在代谢分析中,酶法分析经常会错误地显示相似数量级的代谢流,导致产生不正确的结论。

第二,在生化代谢网络中施加一个已知的扰动,以确定在系统松散之后达到新的稳态时的途径代谢流。常采用的扰动方式包括启动子的诱导、底物补加脉冲、特定碳源消除或物理因素变化等。虽然任何有效的扰动对代谢流的作用都是可以接受的,但扰动应该定位于紧邻途径节点的酶分子上。一种扰动往往能提供多个节点上的信息,这对于精确描述代谢网络控制结构所必需的最小实验量是至关重要的。

第三,系统分析代谢流扰动的结果。如果某个代谢流的扰动对其下游代谢流未能造成可观察的影响,那么就可以认为该处的节点对上游扰动的反应是刚性(Rigid)的,与之相反的情况则称为柔性(Fluxible)。在刚性节点处,试图通过改变上游酶活性来影响下游

代谢流的做法是徒劳的。

除了上述对代谢途径的物质流和能量流进行分析之外,途径工程的概念同样适用于分析信息流,如信号转导途径等。随着分子生物学研究的不断深入,生物体内各种形式的信号转导途径作用机制得以阐明和积累,更进一步的意义在于合理设计、修饰甚至更换受体分子、信号分子、驿站分子以及基因表达调控的顺式元件,构建崭新的信号转导途径,最终形成途径工程新的分支——信号转导途径工程。

途径工程中的基因操作部分已经相当成熟,基因重组、克隆和表达的成功率在很大程度上依赖于生物材料与试剂。惟一值得研究的是重组 DNA 分子在目标生物染色体上的整合机制、频率以及整合子的遗传稳定性,而后者又涉及到细胞生理代谢途径的综合平衡、外源基因表达程度与时段的调控设计以及细胞对目标产物的耐受性等相关问题,因此是途径工程应用的限制性因素。

1.2.2 途径工程的研究技术

途径工程多学科结合的性质决定了它的生长优势,同时也暗示了它在研究方法和技术方面的综合性。归纳起来,有下列三大类常用手段:

(1) 检测技术。常规的化学和生物化学检测手段都可用于途径工程的研究,包括体内确定代谢流的物料平衡和同位素标记示踪方法;表征酶反应进程和性质的酶动力学分析方法;测定同位素富集和关键代谢物相对分子质量分布的光谱学方法,如核磁共振和气相色谱分析等。根据这些测量信息可以判断和描述体内途径代谢流的基本状态,并为细胞的代谢流及其控制分析提供翔实可靠的原始数据。

(2) 分析技术。在获得大量生化反应基本数据的基础上,采用化学计量学、分子反应动力学和化学工程学的研究方法并结合计算机技术,可以进一步阐明细胞代谢途径和代谢网络的动态特征与控制机理,同时确定途径改造的关键靶点。这些分析手段包括能准确测定细胞内代谢流的稳态法、展示代谢流控制过程的扰动法、简化复杂代谢网络分析的组合法以及使生化反应甚至基因表达调控过程定量化的计量法等。

(3) 操作技术。在途径工程中,代谢途径和代谢网络的操作实质上可以归结为基因水平上的操作。这个过程涉及到几乎所有的分子生物学和分子遗传学专门实验技术,如基因和基因簇的克隆、表达、调控;DNA 的杂交检测与序列分析;外源 DNA 的转化;基因的体内同源重组与敲除;整合型重组 DNA 在细胞内的稳定维持等。途径工程技术得以广泛应用的一个重要前提是外源基因在所有生物物种(包括人体)中转化和表达的可行性,而这种可行性又在很大程度上依赖于各种载体和基因表达调控元件的开发。事实上到目前为止,许多物种的基因转化和表达仍然存在技术上的困难。

1.2.3 途径工程的研究战略

就目前所掌握的细胞代谢途径的分子生物学背景知识而言,途径工程的战略思想主要有以下几个方面。

1.2.3.1 在现存途径中提高目标产物的代谢流

在处于正常生理状态下的生物细胞内,对于某一特定产物的生物合成途径而言,其代

谢流变化规律是恒定的。增加目标产物的积累可以从以下 5 个方面入手：

(1) 增加代谢途径中限速步骤酶编码基因的拷贝数。这一战略并没有改变代谢途径的组成和流向,而是增加关键酶基因在细胞内的剂量,通过提高细胞内酶分子的浓度来促进限速步骤的生化反应,进而导致最终产物产量的增加(图 1-4a)。

(2) 强化以启动子为主的关键基因的表达系统。在此情况下,重组质粒在受体细胞中的拷贝数并未增加,强启动子只是高效率地促进转录,合成更多的 mRNA,并翻译出更多的关键酶分子(图 1-4b)。

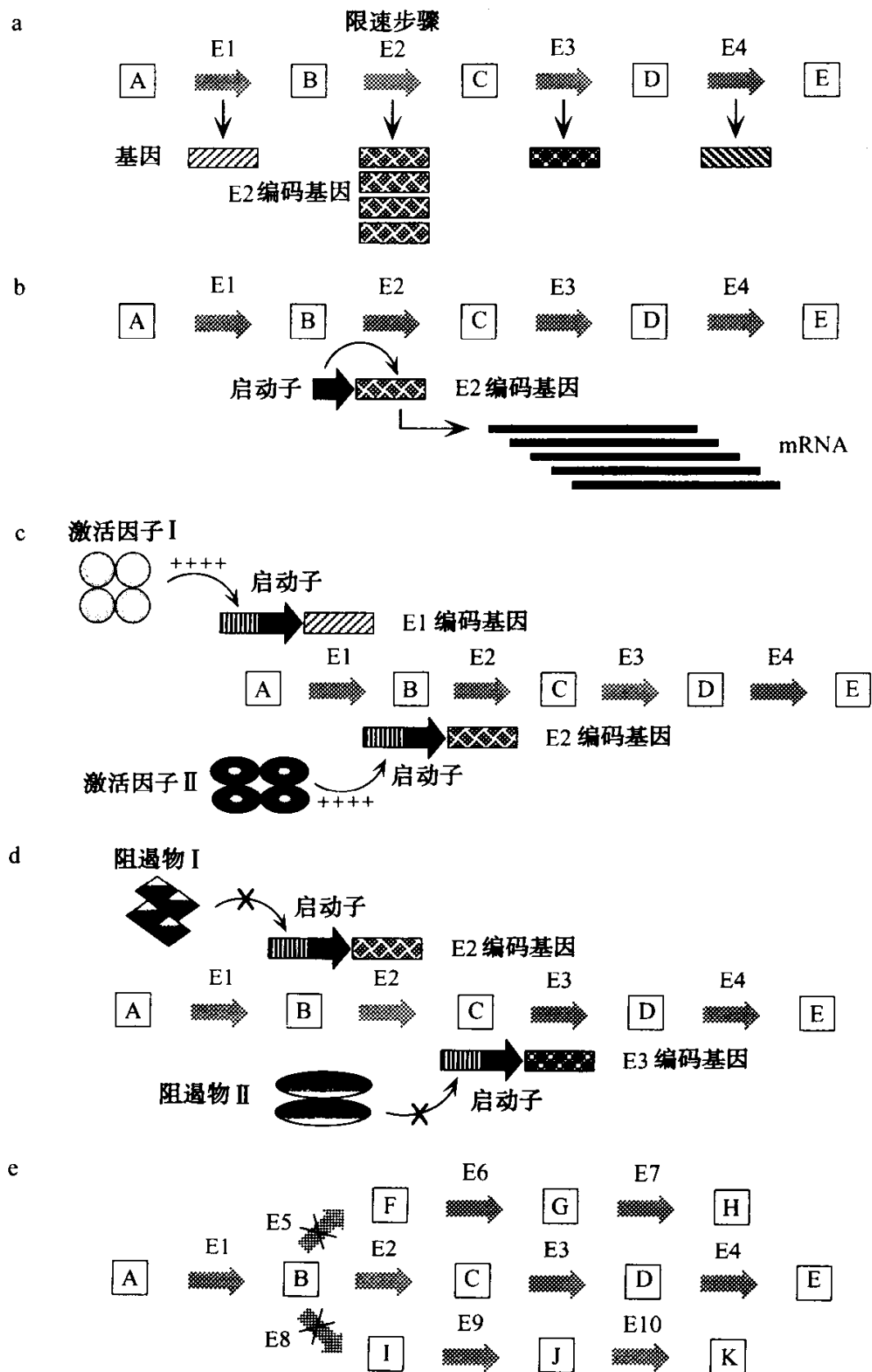


图 1-4 提高现有途径代谢流的基本战略